

## **Inductively heatable polymer encapsulated magnetic particles for coupling bio-ligands**

**Publication number:** DE19800294

**Publication date:** 1999-07-08

**Inventor:** MUELLER-SCHULTE DETLEF DR  
(DE)

**Applicant:** MUELLER SCHULTE DETLEF DR  
(DE)

**Classification:**

**- international:** **A61K33/26; A61L2/00; A61L2/16;  
A61N2/00; B03C1/01;  
G01N33/543; H01F1/00;  
A61K9/16; A61K9/50; A61K33/26;  
A61L2/00; A61L2/16; A61N2/00;  
B03C1/005; G01N33/543;  
H01F1/00; A61K9/16; A61K9/50;  
(IPC1-7): H01F1/44; A61K33/26;  
A61L2/04; C07K17/08; C07K17/10;  
C08L101/12; C12N11/08;  
C12N11/10; C12Q1/68**

**- european:** **A61K33/26; A61L2/00P2;  
A61L2/16; A61N2/00C; B03C1/01;  
G01N33/543D4; H01F1/00E10M;  
Y01N12/00**

**Application number:** DE19981000294 19980107

**Priority number(s):** DE19981000294 19980107

**Report a data error here**

### **Abstract of DE19800294**

Magnetic particles (I) comprises an inductively heatable magnetic core, completely encapsulated in a polymeric matrix on which ligands are chemically coupled. An Independent claim is included for the production of the magnetic particles, comprising encapsulating nanoparticulate or microparticulate magnetic particles in a polymer matrix by emulsion or suspension polymerization, precipitation methods (e.g. a solvent

evaporation technique) or suspension crosslinking; and forming reactive groups coupled with bioligands on the surface.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 00 294 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 00 294.7  
㉔ Anmeldetag: 7. 1. 98  
㉕ Offenlegungstag: 8. 7. 99

㉖ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**H 01 F 1/44**  
A 61 K 33/26  
C 12 N 11/08  
C 12 N 11/10  
C 07 K 17/08  
C 07 K 17/10  
C 12 Q 1/68  
A 61 L 2/04  
C 08 L 101/12

DE 198 00 294 A 1

㉗ Anmelder:  
Müller-Schulte, Detlef, Dr., 52074 Aachen, DE

㉘ Erfinder:  
gleich Anmelder

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

㉙ Induktiv aufheizbare magnetische Polymerpartikel sowie Verfahren zur Herstellung und Verwendung derselben

㉚ Die Erfindung betrifft fein-disperse und grob-disperse magnetische Kolloide, die in einem hochfrequenten Magnetfeld induktiv auf Temperaturen zwischen 40 und 250°C aufgeheizt werden können. Durch Einkapselung der Magnetkolloide in funktionelle Polymermatrizes können Bioliganden an die Matrix gebunden werden, die gemäß dem Affinitätsprinzip in der Lage sind, Analyten spezifisch zu binden. Aufgrund der Kombination der Affinitätsbindung mit der induktiven Aufheizung lassen sich die polymeren Magnetträger sowohl für die biomedizinische Analytik als auch zur Beseitigung von Pathogenen in biologischen Flüssigkeiten einsetzen.

DE 198 00 294 A 1

Die Erfindung betrifft induktiv aufheizbare Partikel, die dadurch gekennzeichnet sind, daß fein verteilte Magnetteilchen in einer funktionellen polymeren Matrix eingekapselt sind, die in der Lage ist, Biomoleküle, Zellen, Bakterien, Toxine, Pilze oder Viren zu binden.

Magnetische Kolloide, die vorwiegend aus Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), Eisenoxid ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) oder Eisenoxyhydroxid ( $\text{FeOOH}$ ) bestehen und eine Partikelgröße von 5–100 nm aufweisen und u. a. als Kontrastmittel in der NMR-Diagnostik, als Informationsspeichermedien, Abdicht- oder Dämpfungsmittel Verwendung finden, sind aus folgenden Veröffentlichungen allgemein bekannt: US-PS 5,492,814; US-PS 4,827,945; DE-OS 38 08 000, US-PS 3,215,572, DE-OS 39 33 210, US-PS 3,917,538, DE-OS 39 33 210, US-PS 4,329,241, PCT/EP 0 275 285, EP 0 586 052. In der Regel werden dabei Eisen(III) und Eisen(II)-Salzlösungen mit variierenden molaren Verhältnissen (2 : 1, 0,5 : 1 bis 4 : 1) durch Zugabe von Basen oder durch Hitzezufuhr in entsprechend kolloidale Magnetdispersionen ("Magnetkolloide") überführt. Um ein besonders durch die Van der Waals Kräfte bedingtes Agglomerieren der Magnetkolloide zu verhindern, werden diesen oberflächenaktive Stoffe zugesetzt, die allgemein unter der Bezeichnung "Tenside", "Emulgatoren", "Stabilisatoren", "Komplexbildner", "surfactants" oder "dispersants" bekannt sind und im folgenden durchweg als "Stabilisatoren" bezeichnet werden, die ein Absetzen des Kolloids in wäßriger Dispersion praktisch verhindert. Solche stabilisierten kolloidalen Dispersionen sind auch unter der Bezeichnung "Ferrofluide" bekannt (vgl. Kaiser und Miskolczy, J. Appl. Phys., 413, 1064, 1970). Sie werden heute auch kommerziell angeboten (Ferrofluidics Corp., USA, Advanced Magnetics, USA, Taibo Co., Japan, Liquids Research Ltd, Wales, BASF, Deutschland, Schering AG, Deutschland). Die verwendeten Stabilisatoren sind entweder kationischer oder anionischer Natur oder nicht-ionisch. Geeignete Verbindungen hierfür sind z. B.: Alkylarylpolyäthersulfate, Laurylsulfonat, Alkylarylpolyäthersulfonate, Phosphatester, Alkoholäthersulfate, Zitate, Ölsäure, Alkyl-naphthalensulfonate, Polystyrolsulfonsäure oder Petroleum-sulfonate als anionische Substanzen, Dodecyltrimethylammoniumchlorid als kationische Tenside sowie Nonylphenoxypolyglycidol, Kerosin, Alkylaryloxypolyäthoxyäthanol, Nonylphenol oder Polyäthylenglykole als nichtionische Substanzen. Eine weitere Stoffklasse, die sich als Kolloidstabilisatoren bewährt haben, sind: Polysaccharide und synthetische Polymere wie Polyvinylalkohol, Polyoxyäthylene oder Proteine (vgl. US-PS 3,917,538, PCT/WO 89/11154, US-PS 4,827,945).

Die Teilchengrößen der mit Hilfe der vorgenannten Präparationsweisen dargestellten Magnetkolloide hängen erfahrungsgemäß von der Konzentration der Base, der Art der Base, der Temperatur sowie dem Salzverhältnis und der Ionenkonzentration ab.

Ein neues Verfahren zur Herstellung stabiler kolloidaler Dispersionen aus Magnetit und  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ohne Anwendung irgendwelcher Stabilisatoren wurde kürzlich von Kang et al. Chem. Mater., 8, 2209–2211, 1996, veröffentlicht. Dabei wird eine Eisen(II)/Eisen(III)-Lösung mit einem molaren Verhältnis von 0,5 bei pH 11–12 unter Sauerstoffausschluß ausgefällt, die zu <10 nm großen Magnetitteilchen führt.

Neben den oben erwähnten Einsatzgebieten werden Magnetkolloide auch im Bereich der medizinischen Diagnostik, der Analytik, der molekularbiologischen Analytik sowie in der Therapie eingesetzt. Dazu werden die Kolloide mit verschiedenen funktionellen Polymersubstraten oder Proteinen (Matrix) beschichtet, die zwei grundsätzliche

Funktionen zu erfüllen haben. Zum einen sollen durch eine möglichst biokompatible Beschichtung unter weitestgehender Umgehung des reticulo-endothelialen Systems (RES) die Bluthalbwertszeiten verlängert werden, zum anderen können an die Matrix Bioliganden z. B. in Form von Antikörpern, Antigenen, Rezeptoren, Lektinen, Oligosacchariden, Aminosäuren, Proteinen oder DNA/RNA-Fragmenten chemisch gebunden werden. Diese Ligandenkopplung ermöglicht gemäß dem Affinitätsprinzip die Bindung zu den Bioliganden komplementären Analyten, wie z. B. Antigene, Antikörper, Proteine, DNA-Fragmente, Zellen, Viren oder Bakterien, deren Bestimmung in der biochemischen oder molekularbiologischen Analytik, der Diagnose und der Therapie eine wichtige Rolle spielt. Matrices, die für solche Zwecke beschrieben wurden, sind z. B. Dextran, Dextrin, Albumin, Silicagel, Polystyrol, Gelatine, Polyglutaraldehyd, Liposome, Polyethylenimin, Polyvinylalkohol, Polyacrolein; sie sind aus den Patentschriften PCT WO 90/07380, PCT WO 89/11154 sowie den US-PS 4,628,037, 3,970,518, 4,230,685, 4,654,267, 4,452,773, 4,369,226, 4,267,234, 3,652,761, 4,675,173 allgemein bekannt. Eine Übersicht über die diversen Magnetpartikel und deren Anwendung sind in "Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers", Häfeli et al. Hrsg., Plenum Press, New York, 1997, beschrieben. Allen vorgenannten Produkten ist gemeinsam, daß sie ihre Funktion aus der komplementären Wechselwirkung eines auf der Matrix gebundenen Bioliganden mit dem zu analysierenden Analyten ableiten. Ihre Einsatzgebiete beschränken sich somit auf die bekannten Felder der Auftrennung und Analyse von Biomolekülen oder der Markierung bestimmter Zellen unter Ausnutzung des klassischen Affinitätsprinzips. Allen vorgenannten Magnetpartikeln ist gemeinsam, daß sie über einen niedrigen Magnetkolloidgehalt durchweg in Form von Magnetit oder Eisenoxiden und somit über eine niedrige Sättigungsmagnetisierung verfügen, die ein effizientes Aufheizen der Partikel in einem magnetischen Wechselfeld weitestgehend ausschließen und daher nur in den üblichen Analysesektoren eingesetzt werden können.

In den US-PS 4,735,796 und 4,662,359 werden Magnetpartikel beschrieben, die speziell für die Tumorthherapie anwendbar sind, derart, daß die vom Tumorgewebe aufgenommenen Magnetpartikel mittels eines äußeren hochfrequenten magnetischen Wechselfeldes induktiv auf Temperaturen oberhalb von 40°C aufgeheizt werden und so zum selektiven Absterben der Tumorzellen führen sollen. Der Nachteil der vorgenannten Mittel und Verfahren für die Tumorthherapie ist jedoch, daß sie weder praktikable Methoden zur Beschichtung mit solchen Polymersubstraten enthalten, die eine eindeutige Beschichtung mit Bioliganden bzw. Antikörpern, so wie sie für den Einsatz in der Diagnostik der Analytik Voraussetzung sind, darlegen noch grundsätzliche Techniken zur Kopplung der erforderlichen Bioliganden aufzeigen.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Mitteln können die erfindungsgemäßen Magnetpartikel aufgrund der kombinatorischen Anwendung des Separationsprinzips und der induktiven Aufheizung erstmals für diagnostische, analytische und therapeutische Zwecke sowie zur Dekontamination eingesetzt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, die biochemische und vor allem molekularbiologische Analytik sowie die medizinische Diagnostik effizienter als bisher zu gestalten.

Das Wirkprinzip der erfindungsgemäßen Mittel besteht darin, auf die Oberfläche einer funktionellen Polymermatrix, in die die induktiv aufheizbaren magnetischen Kolloide bzw. fein dispersen Magnetteilchen eingekapselt sind, Biomoleküle adsorptiv oder kovalent zu binden, die in der Lage

sind, Analyten wie z. B. DNA/RNA-Sequenzen, Antikörper, Antigene, Proteine, Zellen, Bakterien, Viren oder Pilzsporen gemäß dem komplementären Affinitätsprinzip zu binden. Nach der Bindung der Analyten auf der Matrix können die Magnetpartikel in einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld auf die für die Analytik, Diganostik und Therapie relevanten Temperaturen von vorzugsweise 40–120°C aufgeheizt werden.

Um die vorgenannten Verbindungen und Legierungen auf die für die Bioanalytik relevanten Temperaturen aufheizen zu können, bedarf es einer speziellen Auslegung des Magnetfeldes in bezug auf die Magnetfeldstärke sowie die Frequenzen.

Dazu werden in der Regel stromdurchflossene Spulen benutzt, die von einem Hochfrequenzgenerator gespeist werden. Solche Spulensysteme und Hochfrequenzgeneratoren sind allgemeiner Stand der Technik und werden kommerziell angeboten. Die Abmessung der Spulen richten sich nach den jeweiligen Probengrößen; sie weisen allgemein einen Durchmesser von 1–10 cm und eine Länge von 2–30 cm auf. Die erforderliche Ausgangsleistung der HF-Generatoren liegt normalerweise zwischen 0,5 und 1,5 kW. Zum Aufheizen der Magnetproben können grundsätzlich zwei Generatoreinstellungen gewählt werden: a) hohe Frequenz im Bereich von 5–80 MHz und niedrige Magnetfeldstärke von 100–500 A/m oder b) niedrige Frequenz von 0,2–5 MHz in Verbindung mit einer hohen Magnetfeldstärke von 500–15000 A/m. Beide Feldparameterkombinationen gewährleisten eine ausreichende Energieabsorption der Magnetpartikel innerhalb eines kurzen Applikationszeitraumes (<5 Minuten).

Da die Energieabsorption der magnetischen Kolloide und demzufolge die Aufheizung der magnetischen Polymerpartikel von verschiedenen Substanzparametern wie Kolloiddispersität, Kolloidzusammensetzung, Kolloidkonzentration sowie der Art der Wärmekapazität der Polymermatrix abhängt, müssen zur Einstellung einer konkreten Temperatur die Induktionsbedingungen an die jeweiligen Proben adaptiert werden. So absorbieren größere Magnetteilchen durchweg weniger Energie pro Masse als feinere Teilchen mit derselben Zusammensetzung. Demzufolge sind für die induktive Aufheizung grobdisperser Kolloide (>1 µm) hohe magnetische Feldamplituden von >8 kA/m notwendig, um eine signifikante Energieaufnahme bei einer Frequenz von <1000 kHz zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu reichen bei feindispersen Kolloiden mit einer Partikelgröße <200 nm bereits Feldstärken von 2–5 kA/m bei einer Frequenz von <1000 kHz für eine effiziente Aufheizung aus. Neben den auf die jeweiligen Proben anzupassenden Induktionsparametern spielt bei der Aufheizung die Zeitdauer der Induktion bei vorgegebener Magnetfeldeinstellung sowie die Spulenauslegung (Spulenradius, Länge der Spule, Spulenwindungen) im Verhältnis zum Volumen der zu behandelnden Probe eine wesentliche Rolle.

Als magnetische Teilchen für die erfindungsgemäßen Mittel kommen generell alle Verbindungen in Frage, die in einem magnetischen Wechselfeld induktiv aufheizbar sind, d. h. die über eine spontane Magnetisierung verfügen. Verbindungen, die solche Eigenschaften im besonderen Maße besitzen, fallen unter die Kategorie der Ferro-, Ferri- und Superparamagneten. Bezüglich der Klassifizierungen wird auf die Ausführungen von Bean und Livingston, J. Appl. Phys. 30, 1205, 1959 sowie Chagnon et al., US-PS 4,628,037, verwiesen. Zu dieser Substanzklasse gehören z. B. alle Eisen(II) und Eisen(III)-Oxide der Formel  $\text{FeO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  sowie Eisenmischoxide der Formel  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Weitere Verbindungen, die ebenfalls ferromagnetischer Natur sind und grundsätzlich die Bedingungen der induktiven Aufheiz-

barkeit erfüllen, sind Nickel, Cobalt, Gadolinium sowie die Seltenerdenmetalle Dysprosium, Holmium und Terbium sowie ferromagnetische Legierungen aus nicht-ferromagnetischen Elementen. Verbindungen dieser Art, die auch unter der Bezeichnung "Heuslersche Legierungen" allgemein bekannt sind, weisen beispielsweise die Zusammensetzung  $\text{Cu}_2\text{AlMn}$  oder  $\text{Cu}_2\text{SnMn}$  auf. Auch Legierungen aus Eisen, Nickel, Kobalt, Aluminium, Kupfer, Neodym und Bor, die wegen ihrer teilweise sehr hohen Koerzitivkraft als hartmagnetische Werkstoffe zum Einsatz kommen, erfüllen grundsätzlich die oben geforderten Voraussetzungen. Um die oben bezeichneten Werkstoffe in den erfindungsgemäßen Mitteln und Verfahren einsetzen zu können, sollte diese eine Teilchengröße von 0.0052–2 µm, vorzugsweise eine solche von 0,01–1 µm aufweisen. Dadurch ist gewährleistet, daß die Magnetkolloide bei der anschließenden Einkapselung durch ein funktionelles Polymer in fein disperser Form in der Polymermatrix vorliegen.

Die Herstellung entsprechend feindisperser Magnetkolloide bzw. Ferrofluide ist allgemeiner Stand der Technik und erfolgt generell entweder durch naßchemische Fällungsverfahren oder durch einen pulvermetallurgischen Prozeß, bei dem die Magnetteilchen in einer Kugelmühle über einen längeren Zeitraum gemahlen werden (vgl. US-PS 4,329,241, 4,827,945, 4,628,037, 3,917,538).

Es hat sich nun gezeigt, daß das induktive Aufheizen sehr viel einfacher dadurch gestaltet werden kann, daß man ferromagnetische Verbindungen wählt, die eine Curie-Temperatur (nachstehend als "Tc" bezeichnet) von <250°C, vorzugsweise eine solche von 40–120°C besitzen.

Ferromagnetische Substanzen sind besonders dadurch charakterisiert, daß ihr Ferromagnetismus am Curie-Punkt unmittelbar in den Paramagnetismus übergeht. Diese spezielle Eigenschaft kann nun überraschenderweise zu einer raschen und genauen Temperatureinstellung der Magnetpartikel genutzt werden, indem sich paramagnetische Stoffe infolge des drastischen Abfalls der magnetischen Suszeptibilität in dem hier verwendeten hochfrequenten Wechselfeldbereich nicht mehr induktiv aufheizen lassen. Das bedeutet konkret, die Temperatur des Magnetkolloids oszilliert bei eingeschaltetem Magnetfeld nach kurzer Aufheizperiode exakt um den Curie-Punkt, der allein durch die Zusammensetzung des Kolloids festgelegt ist. Unter Anwendung dieses Curie-Punkt-Prinzips spielt daher die genaue Einstellung des äußeren Magnetfeldes sowie die Zeitdauer der Induktion innerhalb der dargelegten grundsätzlich erforderlichen Basisleistung und -frequenz weitestgehend eine untergeordnete Rolle.

Die Festlegung der jeweiligen Temperaturen wird in erster Linie durch die Anwendung im Rahmen der Bioanalytik oder medizinischen Applikation bestimmt.

Als magnetische Substanzen für den Tc-Bereich <120°C kommen eine Reihe von Verbindungen in Frage. Dazu gehören gemischte Ferrite der allgemeinen Formel  $\text{Me}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{P}_4$ , wobei Me Kobalt, Nickel oder Mangan sein können. Durch sukzessive Substitution des Zinks durch die vorgenannten Elemente können sämtliche Tc im Bereich von 40–250°C abgedeckt werden.

Speziell für die auf dem Sektor der DNA-Analytik bzw. -Sequenzierung relevanten Temperaturen von >90°C, 70–75°C und 40–60°C, entsprechend der Denaturierung der DNA, der Primer-Elongationsreaktion sowie der Hybridisierung der Sequenzierprimer ("annealing") sind folgende Mischferrite geeignet: für den Bereich von >90°C  $\text{Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$  oder  $\text{Co}_{0,45}\text{Zn}_{0,55}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , für den Temperaturbereich 70–75°C  $\text{Co}_{0,62}\text{Zn}_{0,38}\text{Fe}_2\text{O}_4$  und für den Bereich 40–60°C z. B.  $\text{Ni}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Co}_{0,39}\text{Zn}_{0,61}\text{Fe}_2\text{O}_4$  oder  $\text{Mn}_{0,4}\text{Zn}_{0,38}\text{Fe}_2\text{O}_4$ . Weitere Verbindungen, die die oben ge-

sind, Analyten wie z. B. DNA/RNA-Sequenzen, Antikörper, Antigene, Proteine, Zellen, Bakterien, Viren oder Pilzsporen gemäß dem komplementären Affinitätsprinzip zu binden. Nach der Bindung der Analyten auf der Matrix können die Magnetpartikel in einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld auf die für die Analytik, Diagnostik und Therapie relevanten Temperaturen von vorzugsweise 40–120°C aufgeheizt werden.

Um die vorgenannten Verbindungen und Legierungen auf die für die Bioanalytik relevanten Temperaturen aufheizen zu können, bedarf es einer speziellen Auslegung des Magnetfeldes in bezug auf die Magnetfeldstärke sowie die Frequenzen.

Dazu werden in der Regel stromdurchflossene Spulen benutzt, die von einem Hochfrequenzgenerator gespeist werden. Solche Spulensysteme und Hochfrequenzgeneratoren sind allgemeiner Stand der Technik und werden kommerziell angeboten. Die Abmessung der Spulen richten sich nach den jeweiligen Probengrößen; sie weisen allgemein einen Durchmesser von 1–10 cm und eine Länge von 2–30 cm auf. Die erforderliche Ausgangsleistung der HF-Generatoren liegt normalerweise zwischen 0,5 und 1,5 kW. Zum Aufheizen der Magnetproben können grundsätzlich zwei Generatoreinstellungen gewählt werden: a) hohe Frequenz im Bereich von 5–80 MHz und niedrige Magnetfeldstärke von 100–500 A/m oder b) niedrige Frequenz von 0,2–5 MHz in Verbindung mit einer hohen Magnetfeldstärke von 500–15000 A/m. Beide Feldparameterkombinationen gewährleisten eine ausreichende Energieabsorption der Magnetpartikel innerhalb eines kurzen Applikationszeitraumes (<5 Minuten).

Da die Energieabsorption der magnetischen Kolloide und demzufolge die Aufheizung der magnetischen Polymerpartikel von verschiedenen Substanzparametern wie Kolloiddispersität, Kolloidzusammensetzung, Kolloidkonzentration sowie der Art der Wärmekapazität der Polymermatrix abhängt, müssen zur Einstellung einer konkreten Temperatur die Induktionsbedingungen an die jeweiligen Proben adaptiert werden. So absorbieren größere Magnetteilchen durchweg weniger Energie pro Masse als feinere Teilchen mit derselben Zusammensetzung. Demzufolge sind für die induktive Aufheizung grobdisperser Kolloide (>1 µm) hohe magnetische Feldamplituden von >8 kA/m notwendig, um eine signifikante Energieaufnahme bei einer Frequenz von <1000 kHz zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu reichen bei feindispersen Kolloiden mit einer Partikelgröße <200 nm bereits Feldstärken von 2–5 kA/m bei einer Frequenz von <1000 kHz für eine effiziente Aufheizung aus. Neben den auf die jeweiligen Proben anzupassenden Induktionsparametern spielt bei der Aufheizung die Zeitdauer der Induktion bei vorgegebener Magnetfeldeinstellung sowie die Spulenauslegung (Spulenradius, Länge der Spule, Spulenwindungen) im Verhältnis zum Volumen der zu behandelnden Probe eine wesentliche Rolle.

Als magnetische Teilchen für die erfindungsgemäßen Mittel kommen generell alle Verbindungen in Frage, die in einem magnetischen Wechselfeld induktiv aufheizbar sind, d. h. die über eine spontane Magnetisierung verfügen. Verbindungen, die solche Eigenschaften im besonderen Maße besitzen, fallen unter die Kategorie der Ferro-, Ferri- und Superparamagneten. Bezüglich der Klassifizierungen wird auf die Ausführungen von Bean und Livingston, J. Appl. Phys. 30, 1205, 1959 sowie Chagnon et al., US-PS 4,628,037, verwiesen. Zu dieser Substanzklasse gehören z. B. alle Eisen(II)- und Eisen(III)-Oxide der Formel FeO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sowie Eisenmischoxide der Formel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Weitere Verbindungen, die ebenfalls ferromagnetischer Natur sind und grundsätzlich die Bedingungen der induktiven Aufheiz-

barkeit erfüllen, sind Nickel, Cobalt, Gadolinium sowie die Seltenerdenmetalle Dysprosium, Holmium und Terbium sowie ferromagnetische Legierungen aus nicht-ferromagnetischen Elementen. Verbindungen dieser Art, die auch unter der Bezeichnung "Heuslersche Legierungen" allgemein bekannt sind, weisen beispielsweise die Zusammensetzung Cu<sub>2</sub>AlMn oder Cu<sub>2</sub>SnMn auf. Auch Legierungen aus Eisen, Nickel, Kobalt, Aluminium, Kupfer, Neodym und Bor, die wegen ihrer teilweise sehr hohen Koerzitivkraft als hartmagnetische Werkstoffe zum Einsatz kommen, erfüllen grundsätzlich die oben geforderten Voraussetzungen. Um die oben bezeichneten Werkstoffe in den erfindungsgemäßen Mitteln und Verfahren einsetzen zu können, sollte diese eine Teilchengröße von 0,0052–2 µm, vorzugsweise eine solche von 0,01–1 µm aufweisen. Dadurch ist gewährleistet, daß die Magnetkolloide bei der anschließenden Einkapselung durch ein funktionelles Polymer in fein disperser Form in der Polymermatrix vorliegen.

Die Herstellung entsprechend feindisperser Magnetkolloide bzw. Ferrofluide ist allgemeiner Stand der Technik und erfolgt generell entweder durch naßchemische Fällungsverfahren oder durch einen pulvermetallurgischen Prozeß, bei dem die Magnetteilchen in einer Kugelmühle über einen längeren Zeitraum gemahlen werden (vgl. US-PS 4,329,241, 4,827,945, 4,628,037, 3,917,538).

Es hat sich nun gezeigt, daß das induktive Aufheizen sehr viel einfacher dadurch gestaltet werden kann, daß man ferromagnetische Verbindungen wählt, die eine Curie-Temperatur (nachstehend als "Tc" bezeichnet) von <250°C, vorzugsweise eine solche von 40–120°C besitzen.

Ferromagnetische Substanzen sind besonders dadurch charakterisiert, daß ihr Ferromagnetismus am Curie-Punkt unmittelbar in den Paramagnetismus übergeht. Diese spezielle Eigenschaft kann nun überraschenderweise zu einer raschen und genauen Temperatureinstellung der Magnetpartikel genutzt werden, indem sich paramagnetische Stoffe infolge des drastischen Abfalls der magnetischen Suszeptibilität in dem hier verwendeten hochfrequenten Wechselfeldbereich nicht mehr induktiv aufheizen lassen. Das bedeutet konkret, die Temperatur des Magnetkolloids oszilliert bei eingeschaltetem Magnetfeld nach kurzer Aufheizperiode exakt um den Curie-Punkt, der allein durch die Zusammensetzung des Kolloids festgelegt ist. Unter Anwendung dieses Curie-Punkt-Prinzips spielt daher die genaue Einstellung des äußeren Magnetfeldes sowie die Zeitdauer der Induktion innerhalb der dargelegten grundsätzlich erforderlichen Basisleistung und -frequenz weitestgehend eine untergeordnete Rolle.

Die Festlegung der jeweiligen Temperaturen wird in erster Linie durch die Anwendung im Rahmen der Bioanalytik oder medizinischen Applikation bestimmt.

Als magnetische Substanzen für den Tc-Bereich <120°C kommen eine Reihe von Verbindungen in Frage. Dazu gehören gemischte Ferrite der allgemeinen Formel Me<sub>1-x</sub>Zn<sub>x</sub>Fe<sub>2</sub>P<sub>4</sub>, wobei Me Kobalt, Nickel oder Mangan sein können. Durch sukzessive Substitution des Zinks durch die vorgenannten Elemente können sämtliche Tc im Bereich von 40–250°C abgedeckt werden.

Speziell für die auf dem Sektor der DNA-Analytik bzw. -Sequenzierung relevanten Temperaturen von >90°C, 70–75°C und 40–60°C, entsprechend der Denaturierung der DNA, der Primer-Elongationsreaktion sowie der Hybridisierung der Sequenzierprimer ("annealing") sind folgende Mischferrite geeignet: für den Bereich von >90°C Ni<sub>0,73</sub>Zn<sub>0,27</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> oder Co<sub>0,45</sub>Zn<sub>0,55</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, für den Temperaturbereich 70–75°C Co<sub>0,62</sub>Zn<sub>0,38</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> und für den Bereich 40–60°C z. B. Ni<sub>0,75</sub>Zn<sub>0,25</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Co<sub>0,39</sub>Zn<sub>0,61</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> oder Mn<sub>0,42</sub>Zn<sub>0,58</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Weitere Verbindungen, die die oben ge-

forderten Bedingungen erfüllen, sind: Li-Fe-Cr-Oxide der allgemeinen Zusammensetzung  $\text{Fe}_x\text{Li}_y\text{Cr}_z\text{O}_4$  ( $x = 0,1-0,9$ ,  $y = 0,5$ ), Chromspinelle wie  $\text{MnCr}_2\text{O}_4$  (Tc:  $77^\circ\text{C}$ ) sowie  $\text{MnFe}_{2-x}\text{Cr}_x\text{O}$  und  $\text{MgCrFeO}_4$  (Tc:  $50^\circ\text{C}$ ). Grundsätzlich in Frage kommen auch Seltene-Erd/Übergangsmetall-Legierungen aus der 2 : 17 Serie, speziell  $\text{Pr}_2\text{Fe}_{17}$  und  $\text{Er}_2\text{Fe}_{17}$ . Eine Feinabstimmung in Richtung höherer Tc kann dabei in der Weise vorgenommen werden, daß ein Teil des Eisens durch Kobalt ersetzt werden kann. Auch die als Heuslersche Legierungen bekannten Verbindungen aus z. B. Mangan, Zinn, Arsen, Antimon, Bor, Wismut mit Zusätzen von Kupfer erfüllen die geforderten Bedingungen.

Die Herstellung solcher Verbindungen oder Legierungen mit niedriger Tc erfolgt naßchemisch mit Hilfe der Kopräzipitation einer entsprechenden Salzlösung, der Sprühtrocknung, der Gefriertrocknung, des Sol-Gel-Verfahrens oder der Precursor-Methode. Alternativ lassen sich diese Verbindungen auch durch einen mehrtägigen Mahlprozeß in einer Kugelmühle herstellen. Beide Herstellungsweisen wie auch die Einstellung der Teilchengrößen der vorgenannten Verbindungen sind allgemeiner Stand der Technik (vgl. R. Valenzuela, "Magnetic Ceramics", Cambridge University Press, 1994, J. Smit und H. P. J. Wijn, "Ferrites", Wiley, New York, 1959).

Neben den magnetischen Eigenschaften der Kolloide und dem daraus resultierenden Induktionsverhalten, spielt für die Anwendung der Magnetpartikel die Art der Polymermatrix, in die diese eingekapselt sind, eine wesentliche Rolle. Die Polymermatrix muß folgende Bedingungen erfüllen: a) chemische Funktionalität und b) Biokompatibilität. Die chemische Funktionalität ermöglicht die chemische Kopplung von Bioliganden z. B. in Form von Zellrezeptoren, Antikörpern oder Nukleinsäurefragmenten gemäß den bekannten Verfahren zur Bindung von Liganden an Trägermedien. Die Biokompatibilität erfüllt die Voraussetzung für den Einsatz der Magnetpartikel vor allem im diagnostischen und therapeutischen Bereich.

Polymere, die diesen Anforderungen genügen, gehören in der Regel der Klasse der Hydrogele an, deren Biokompatibilität sich in erster Linie aus dem hohen Wassergehalt (>80%) ableitet. Basis zur Festlegung der Biokompatibilität, die im biochemischen Bereich nicht genau definiert ist, sind die cytotoxischen Eigenschaften der eingekapselten Magnetkolloide. Dazu werden die Magnetpartikel über einen Zeitraum von 24 Stunden mit HeLa- und Endothelzellsuspensionen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird die Zellintegrität und Zellmorphologie durch Anfärben mit Ethidiumbromid/Acridinorange sowie mit Hilfe mikroskopischer Methoden ermittelt (vgl. Warring, Antibiotics III 141, Springer Verlag, 1975, Darzynkiewicz und Kapuscinski, Flow Cytometry and Sorting, Melamed et al. Hrsg., Wiley, S. 291, 1990). Als Maßgabe für die Auswahl der betreffenden Polymermatrizes wurde eine >95%ige Erhaltung der Zellintegrität und Zellmorphologie zugrunde gelegt. Polymere, die die obigen Kriterien erfüllen, sind vorzugsweise Poly- und Oligosaccharide, Polysaccharid-Abkömmlinge, wie Hyaluronate, Alginate, Dextran, Agarose, Dextrin, Stärke, Heparin, Hydroxyäthylzellulose, weiterhin synthetische Polymere wie Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polyurethane, Polyoxyäthylene, Polylactid, Polyglycolid, Polycyanoacrylate, Polyhydroxyäthylmethacrylate sowie Copolymere dieser Substanzen. Ferner kommen Proteine wie z. B. Gelatine, Casein, Collagen, Albumin, Fibrinogen oder Polyaminsäuren in Frage.

Zur Einkapselung der magnetischen Kolloide mit den Polymeren sind grundsätzlich solche Verfahren anwendbar, die die Magnetkolloide vollständig einzukapseln vermögen und entsprechend isolierte nano- oder mikropartikuläre Ma-

gnatpartikel ergeben. Vorteilhafterweise kommen hierfür die allgemein bekannten Verfahren wie Suspensionsvernetzung ("suspension-crosslinking"), Emulsionspolymerisation, Suspensionspolymerisation oder Präzipitationsverfahren ("Solvent-Evaporations-Prozeß") aus organischer Phase zu Anwendung. Die Differenzierung zwischen Emulsion und Suspension bezieht sich im folgenden durchweg auf die verschiedenen Partikelgrößen: Emulsion für Partikelgrößen  $<1\ \mu\text{m}$  und Suspension für solche  $>1\ \mu\text{m}$ .

Beim Suspensionsvernetzungsverfahren wird eine wäßrige Polymerlösung, in der das magnetische Kolloid dispergiert ist, in einer mit Wasser nicht mischbaren Phase (organische Phase) suspendiert und anschließend mit einem geeigneten bi- oder trifunktionellen Vernetzter vernetzt (vgl. US-PS 4,345,588 und PCT Anmeldung EP 96/0239). Wasserlösliche Polymere, die für dieses Verfahren vorzugsweise in Frage kommen, sind z. B. Serumalbumin, Proteoglycane, Glykoproteine, Polyvinylalkohol, Zellulose, Agarose, Dextran, Alginate, Hyaluronate, Stärke, Polyhydroxyäthylmethacrylate. Als organische Phase eignen sich Öle wie Paraffinöle, Pflanzenöle, Siliconöle, Baumwollsaatöl oder organische Lösungsmittel wie Chloroform, Butanol, Heptanol, Toluol, Benzol, Essigester, Hexan, Heptan, Octan sowie Mischungen derselben. Um die Tröpfchengröße bei dem Suspensionsprozeß in Richtung der für die analytischen Zwecke bevorzugten kleinen Partikelgrößen von  $0,5-5\ \mu\text{m}$  zu verschieben, werden der Dispergierphase in der Regel 0,3-15 Gew.-% Stabilisatoren, die bevorzugt der Gruppe der Polyoxyäthylendaddukte, Polyoxyäthylensorbitolester, Polyäthylpropylenoxid-Blockcopolymeren, Alkylphenoxypolyäthoxyäthanol, Fettalkoholglycoläther-Phosphorsäureester, Sorbitan-Fettsäureester, Polyoxyäthylalkohole, Polyoxyäthylensorbitanfettsäureester, oder Polyoxyäthylensäuren angehören, zugegeben. Die Volumenverhältnisse von organischer Phase zur Polymer/Magnetkolloid-Phase variieren dabei zwischen 10 : 1 und 60 : 1, die der Polymer-Phase zur Kolloid-Phase in der Regel zwischen 1 : 0,5 und 1 : 4, vorzugsweise zwischen 1 : 1 und 1 : 3, wobei das Polymer-/Magnetkolloid-Verhältnis durch die jeweilige Menge des Festkörperanteiles im Kolloid bestimmt wird. Dieser liegt in der Regel zwischen 1 und 10 Gew.-% Der Magnetfestkörperanteil im Polymeren beträgt vorteilhafterweise 20 bis 60 Gew.-%. Dieser hohe Magnetkolloidanteil, durch den sich die erfindungsgemäßen Mittel grundlegend von den herkömmlichen magnetischen Polymerträgern unterscheiden, wird deswegen gewählt, da neben der magnetischen Suszeptibilität die Effizienz des induktiven Aufheizens, d. h. die bei vorgegebenen Induktionsbedingungen erzielte Aufheizung bzw. Aufheizrate direkt von der Menge des Magnetanteils in den Partikeln bestimmt wird. Geeignete Vernetzer für die Polymermatrix sind di- und trifunktionelle Substanzen, die mit den funktionellen Gruppen der Matrix (z. B. Hydroxyl-, Carboxyl-, Aminogruppen) reagieren können. Geeignete Beispiele, die hierfür in Frage kommen, sind: Alkyldihalogenide, Glutaraldehyd, Di- und Triisocyanate, Divinylsulfon, Bromcyan, Triallylisocyanurat, Divinyläthylharnstoff, Epichlorhydrin, 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid, 1,4-Butandioldivinyläther, Divinylsuccinat, Divinylglutarat, Divinyladipat. Die Menge des Vernetzers, die in erster Linie durch die Feinheit des Magnetkolloids festgelegt wird, beträgt in der Regel 0,5-10 Mol.-%, bezogen auf den Polymeranteil. Durchweg höhere Vernetzungsgrade sind erforderlich, um im Falle sehr feiner Kolloide ein Herausdiffundieren aus der Matrix zu verhindern.

Analog zum Vernetzungsverfahren in Suspension bietet auch die Suspensionspolymerisation die Möglichkeit, die Magnetkolloide in definierter Weise einzukapseln. Dazu wird ein wasserlösliches Vinylmonomer in einer mit dem



Monomeren nicht mischbaren organischen Phase suspendiert und anschließend unter Zugabe geeigneter Stabilisatoren radikalisch polymerisiert. Verfahren dieser Art sind aus der Literatur bekannt (vgl. *Paine et al., Macromolecules*, 23, 3104, 1990, *Tuncel et al., J. Appl. Polym. Sci.*, 50, 303, 1993, *Takahashi et al., J. Polymer Sci., Part A: Polymer Chem.*, 34, 175–182, 1996). Als Monomere kommen wasserlösliche Monomere wie z. B. Vinylpyrrolidon, Acrylamid, 2-Hydroxyäthyl-methacrylat, Hydroxyäthylacrylat, Acrylsäure, Methacrylsäure sowie Mischungen derselben in Frage. Die Dispergierphasen entsprechen durchweg den bei der Suspensionsvernetzung angegebenen organischen, nicht mit Wasser mischbaren Phasen. Als Suspensionsstabilisatoren kommen in der Regel dieselben Stabilisatoren zur Anwendung wie beim vorgenannten Vernetzungsverfahren. Innerhalb dieser Verfahrenstechnik hat sich für die Einkapselung vor allem 2-Hydroxyäthylmethacrylat als vorteilhaft erwiesen, da das Polymere einerseits die Voraussetzungen eines Hydrogels erfüllt, andererseits aufgrund seiner chemischen Struktur hochfunktional ist. Für die Einkapselung mit diesem Polymeren haben sich überraschenderweise Stabilisatoren in Form von synthetischen Polymersystemen wie z. B. Polymethylmethacrylat, Methacryloyl-Endgruppen enthaltendes Polymethylmethacrylat, Polystyrol, Polystyrol-derivate oder Polybutadienderivate als besonders vorteilhaft erwiesen. Die Mengenverhältnisse von Polymer zu Magnetkolloid sind analog zu denen im vorgenannten Vernetzungsverfahren.

Eine weitere Methode zur Einkapselung der Magnetkolloide leitet sich aus den bekannten Verfahren zur Herstellung von Polymerpartikeln mit Hilfe der Emulsionspolymerisation ab, wie sie für Styrol, Methylmethacrylat und Glycidylmethacrylat beschrieben wurde (vgl. *Woods et al., J. Paint Technol.*, 40, 541–548, 1968, *Smigol et al., Angew. Makromol. Chem.*, 195, 151–164, 1992, *Okubo und Shiozaki, Polymer Int.*, 30, 469–474, 1993). Diese wird vorteilhafterweise entweder durch Zugabe anionischer Tenside wie Polyacrylsäure oder Dodecylbenzylsulfonat, nichtionischer Tenside wie Alkylphenylpolyäthylenglykole oder Polyäthylenglykoltrimethylnonyläther, kombinierte Zugabe anionischer und nicht-ionischer Tenside oder aber unter emulgatorfreien Bedingungen durchgeführt, wobei letztere Verfahrensweise wahlweise in Gegenwart von Natriumchlorid erfolgen kann.

Unter Zugrundelegung dieser Verfahrenstechnik konnte nun überraschenderweise gezeigt werden, daß durch Zugabe von lipophilen oder semi-lipophilen Tensiden stabilisierte Magnetkolloide zur Emulsionspolymerisationsansatz diese in die sich bildenden Polymerpartikel eingekapselt werden. Geeignete oberflächenaktive Substanzen sind solche, die einen HLB-Wert (Hydrophilic-Lipophilic-Balance, siehe *Griffin, J. Soc. Cosmetic Chemists*, 5, 249–255, 1954) von 1–12 aufweisen. Beispiele hierfür sind: Polyäthylenpropylenoxid-Blockcopolymer, Alkylphenoxypolyäthoxyäthanol, Polyoxyäthylenalkohole, Polyoxyäthylen-sorbitanfettsäureester, Sorbitanfettsäureester.

Folgende Reaktionsansätze haben sich als geeignet erwiesen: Monomerkonzentration 0,7–5,2 Mol/Liter, Initiatorkonzentration 1–10 mMol/Liter, Stabilisatorkonzentration 0,1–80 mMol/Liter; die Natriumchlorid-Konzentration kann wahlweise bis zu 20 mMol/Liter betragen. Diese Ansätze liefern Magnetpartikel mit Partikelgrößen zwischen 0,4 und 8 µm.

Zur Herstellung der Magnetpartikel nach dem Solvent-Evaporations-Prozeß, der eine spezielle Methode innerhalb der Präzipitationstechnologie darstellt, geht man in der Regel von einem Zweiphasensystem aus, das aus einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Polymerphase und ei-

nem wäßrigen Dispersionsmittel besteht. Dabei wird die lipophile Polymerphase, in der zunächst das Magnetkolloid dispergiert wird, unter definierten Rührbedingungen in der wäßrigen Phase suspendiert. Durch den Kontakt mit der wäßrigen Phase fällt das Polymere unter Verdampfen des Lösungsmittels in Form isolierter Partikel aus. Erfahrungsmäßig können mit Hilfe der Rührgeschwindigkeit sowie durch Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen sowohl zur organischen als auch zur Dispersionsphase die Partikelgrößen im Bereich von 1–250 µm variiert werden. Alternativ läßt sich die organische Polymerphase auch mit Hilfe einer Sprühhvorrichtung in die hydrophile Phase eintragen. Sprühsysteme und Verfahren dieser Art sind allgemeiner Stand der Technik (vgl. *Iwata und McGinity, J. Microencapsulation*, 9, 201–214, 1992; *Thoma und Schlütermann, Pharmazie*, 47, 115–119, 1991). Polymere, die sich für ein solches Herstellungsverfahren eignen, sind grundsätzlich solche Polymere, die in organischen Lösungsmitteln, nicht aber in wäßrigem Milieu löslich sind. Beispiele hierfür sind: Polystyrol, Poly(lactid-co-glycolid), Polymethacrylat, Polyamide, Polyester, Polyvinyläther, Polyvinylacetale, Polyvinylketone, Polyvinylhalogenide, Polyvinylester oder Polycarbonate. Geeignete Lösungsmittel für diese Polymeren sind erfahrungsgemäß z. B.: Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Trifluoressigsäure, Trifluoräthanol, Phosphorsäuretrisdimethylamid, Dioxan, Tetrahydrofuran, Ester, Pyridin, halogenierte Kohlenwasserstoffe sowie aromatische, halogenierte und nicht halogenierte Verbindungen. Die Volumenverhältnisse der wäßrigen Phase zu der organischen Polymerphase, die in der Regel 1–10 Gew.-% Polymer enthält, beträgt durchweg 10–30 : 1.

Die umgekehrte Verfahrensweise, ein im wäßrigen Medium lösliches Polymer durch Dispergieren in einer lipophilen Phase (vorzugsweise Öle oder chlorierte Kohlenwasserstoffe) und anschließende Zugabe eines organischen, mit Wasser mischbaren Nicht-Lösemittels (z. B. Aceton, Methanol, Äthanol) auszufällen, führt in Analogie zur vorgenannten Verfahrensweise auch zu definierten Kolloid-Einkapselungen. Geeignete Polymersysteme, die hierfür in Frage kommen, sind 1–10%ige wäßrige Lösungen aus beispielsweise Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polysacchariden, Polysaccharidderivaten, Polyhydroxyäthylmethacrylat oder Proteinen.

Die Kopplung der für die Bioanalytik relevanten Liganden wie Oligosaccharide, Glykoproteine, Avidin, Biotin, Lektine, Antikörper, Antigene, DNA- oder RNA-Fragmente an die polymerbeschichteten Magnetkolloide erfolgt nach den bekannten Verfahren zur Immobilisierung von Bioliganden an polymere Träger (vgl. "Methods in Enzymology", *Mosbach Hrsg.*, Vol 135 Part B, Academic Press, 1987, S. 3–169). Als Kopplungsmedien kommen solche Agenzien in Frage, die sich bei der Präparation von Affinitätsharzen bewährt haben wie z. B. Bromcyan, Carbodiimide, Hexamethylendiisocyanat, Tosylchlorid, Tresylchlorid, 2-Fluor-1-methyl-pyridinium-toluol-4-sulfonat, Epichlorhydrin, N-Hydroxysuccinimid, Chlorcarbonat, Isonitril, Hydrazid, Glutaraldehyd; 1,1'-Carbonyl-diimidazol, 1,4-Butandiol-diglycidyläther. Besonders günstig sind darüber hinaus die Kopplungen der Bioliganden über sogenannte Spacer-Moleküle, hetero-bifunktionelle, reaktive Verbindungen, die sowohl mit den funktionellen Gruppen der Matrix (Carboxyl-, Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Aminogruppen) als auch mit dem Bioliganden eine chemische Bindung eingehen können. Beispiele hierfür sind: Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat, 4-Succinimidylloxycarbonyl- $\alpha$ -(2-pyridylthio)toluol, Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat, N- $\gamma$ -Maleimidobutyryloxysuccinimidester, 3-(2-Pyridylthio)propionylhydrazid, Sulfosuccinimi-



dyl-2-(p-azidosalicylamido)äthyl-1,3'-dithiopropionat (vgl. Ullmanns Encyclopädie der Technischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 10, und G.T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996).

Aus dem den erfindungsgemäßen Mitteln zugrundeliegenden kombinatorischen Prinzip der Affinitätsbindung und des induktiven Aufheizens, eröffnen sich Anwendungen, deren Breite den herkömmlichen Mitteln durchweg verschlossen bleibt. Dies betreffen vor allem die Dekontamination von Pathogenen bzw. infektiösen Keimen in biologischen Flüssigkeiten (z. B. Blut, Plasma, Serum, Blutkonserven). Es lassen sich so Viren, z. B. Hepatitis-Viren oder das "Human Immunodeficiency Virus" (HIV), darüber hinaus Bakterien, Pilzsporen oder auch tierische Proteine, die im Zuge einer Impferumentwicklung grundsätzlich mitanfallen und zu allergischen Reaktionen führen können, selektiv entfernen, indem die Magnetpartikel nach Bindung der Pathogene induktiv auf vorzugsweise 70–100°C aufgeheizt werden, die die betreffenden Keime abtöten bzw. weitestgehend inaktivieren. Im Bereich der medizinischen Therapie ergibt sich ferner die Möglichkeit, Medikamente in die polymeren Magnetpartikel miteinzukapseln ("drug-depot"), die, im Körper verabreicht, durch die induktive Aufheizung kontrolliert in den Körper abgegeben werden können, indem die Polymermatrix auf Temperaturen oberhalb der Glastemperatur aufgeheizt werden, aus der eine verstärkte Medikamentenfreigabe resultiert.

Das wesentliche Merkmal der erfindungsgemäßen Mittel besteht darin, die eingekapselten Magnetkolloide mit Hilfe eines äußeren Magnetfeldes auf definierte Temperaturen im Bereich von vorzugsweise 40–120°C aufzuheizen. Ziel dabei ist es, bestimmte auf der Polymermatrix immobilisierte Biomoleküle bzw. Bioliganden im Rahmen spezieller Umsetzungen oder bioanalytischer Verfahren in eine aktive Form zu überführen, die bei Normaltemperatur nicht oder nur bedingt realisiert werden kann. Beispiele für solche Umsetzungen bzw. Anwendungen, die bei höheren Temperaturen ablaufen bzw. möglich sind, sind die Isomerisierung von Glucose-Syrup zu Glucose und Fructose mittels Glucoseisomerase, eine Reaktion, die erst merklich bei 60°C abläuft sowie die DNA-Sequenzierung mit Hilfe der Taq DNA-Polymerase, einem hochprozessiven Enzym des Bakteriums *thermus aquaticus*, das erst oberhalb 70°C aktiv wird. Ein weiteres Beispiel ist die Auftrennung von DNA-Doppelsträngen bei >90°C (Denaturierung), eine Methode, die ebenfalls zur DNA-Sequenzierung z. B. im Rahmen der medizinischen Diagnostik zur Bestimmung von Krankheitserregern (Viren, Bakterien, Pilzsporen) eine zunehmend wichtige Rolle spielt.

Aufgrund der Kombination einer affinen Bindung und des induktiven Aufheizens lassen sich die erfindungsgemäßen Mittel überraschenderweise im klinisch-medizinischen Bereich einsetzen, um z. B. pathogene Keime im potentiell infektiösen Stoffen zu beseitigen. Zu diesem Zweck werden an die Magnetpartikel Rezeptormoleküle bzw. Bioliganden gekoppelt, die mit dem Pathogen eine komplementäre Bindung eingehen können. Nach der Bindung des Pathogens an die Magnetpartikel werden diese in einem externen, hochfrequenten Magnetfeld induktiv auf solche Temperaturen aufgeheizt, die das Abtöten des jeweiligen Infektionskeimes vermögen. Durch die spezifische Bindung Magnetpartikel-Pathogen ist gewährleistet, daß die Erhitzung auf die Magnetpartikel und demzufolge auf die von den Magnetpartikeln gebundenen pathogenen Substanzen beschränkt bleibt. Die übrigen Bestandteile der Flüssigkeit werden dabei praktisch nicht mitaufgeheizt. Die vorgenannte Verfahrensweise kann beispielsweise zur Beseitigung bestimmter Viren im Blut oder Blutkonserven, z. B. Hepatitis-Viren, HI-Viren

(Human Immunodeficiency Virus) genutzt werden. Dazu werden virusspezifische Antikörper an die Magnetpartikel chemisch gekoppelt. Der Magnetpartikel-Pathogen-Komplex wird anschließend induktiv auf 80–120°C für kurze Zeitintervalle (< eine Minute) erhitzt, eine Behandlung, die zur weitgehenden Inaktivierung der entsprechenden Viren geeignet ist.

Ein weiteres Einsatzgebiet für die induktiv aufheizbaren Magnetpartikel stellt das Gebiet der Separationstechnologie dar, hier im besonderen die Affinitätstrenntechnik. Bei dieser Art der Auftrennung spielt neben der Auswahl geeigneter Affinitätsliganden, die die Selektivität des Verfahrens bestimmt, vor allem auch das Elutionsverhalten des Affinitätsmediums eine entscheidende Rolle für die Effizienz der Separation. In der Regel werden hierfür bestimmte Pufferlösungen häufig unter Zugabe eines chaotropen Salzes, z. B. Natriumrhodanid, verwendet, deren Molarität und pH-Werte sorgfältig ausgewählt werden müssen, um eine weitgehend vollständige Elution des Analyten unter Beibehaltung der biologischen Aktivität ermöglichen zu können. Die Anwendung der erfindungsgemäßen Magnetpartikel eröffnet hier überraschenderweise eine neue Perspektive, die Elution der Analyten sehr viel effizienter zu gestalten. Infolge der induktiven Aufheizung der Magnetpartikel kommt es zu einer Schwächung der Bioliganden-Analyt-Bindung, die unter Vermeidung der sonst rigiden Elutionsbedingungen eine leichtes Ablösen des Analyten von der stationären Phase bedingen. Dieses neuartige Elutionsprinzip ist besonders vorteilhaft im Bereich der Avidin bzw. Streptavidin-Biotin-Technik anwendbar. Die hohe Affinität zwischen Avidin und Biotin wird in zunehmendem Maße in der biochemischen und molekularbiologischen Analytik genutzt, um beispielsweise im Bereich der DNA-Sequenzierung, DNA-Detektion, des Hybridisierungsassays, der Zellseparation oder des Enzymassays durchzuführen. Hierbei wird die extrem hochaffine Bindung zwischen Avidin und Biotin ( $K_d < 10^{-15}$ ) in der Weise genutzt, daß an die Avidin-gekoppelte Festphase biotinylierte Analyten z. B. in Form von DNA-Sonden bzw. Oligonukleotiden gebunden werden, die sich in einfacher Weise aus einem Substanzgemisch isolieren lassen. Das grundsätzliche Problem bei allen Avidin-Biotin-Separationen ist, daß aufgrund der extrem hohen Bindungskonstanten eine Elution des Biotin-Analyten ohne Desaktivierung des Avidins und des Analyten praktisch nicht möglich ist. Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, daß durch induktives Aufheizen der Avidin-gekoppelten Magnetpartikel eine Elution der biotinylierten Analyten möglich wird. Dazu werden die Magnetpartikel in der Regel auf 50–70°C induktiv aufgeheizt und simultan mit einem 0,5–1 M NaCl und/oder 40–60% Äthylenglykol enthaltenden 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer, pH 8,5–10, z. B. eluiert.

In eine analoge Richtung wie die Pathogenbeseitigung zielt eine andere Anwendung, bei der es darum geht, Impfsen, die aus Tieren gewonnen werden, in höherer Reinheit zu gewinnen. Das generelle Ziel ist dabei, die nach der Immunisierung der Tiere gewonnenen Antisera möglichst weitgehend von tierischen Begleitsubstanzen wie Antikörpern zu befreien, die potentiell allergen wirken können. Zur Entfernung speziell tierischer Antikörper werden gegen das Fc-Fragment des Antikörpers gerichtete Sekundäntikörper an die Magnetpartikel gekoppelt. Nach entsprechender Inkubation der anti-Fc-IgG beschichteten Magnetpartikel über einen Zeitraum von, je nach Serumvolumen, 15–30 Minuten werden die Magnetpartikel in Intervallen (< eine Minute) induktiv gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren über einen Gesamtzeitraum von 10 Minuten auf Temperaturen von 60–80°C aufgeheizt. Diese Behandlung reicht in der Regel aus, um >90% der Nebenbestandteile tierischen Ur-

sprungs zu inaktivieren.

Die erfindungsgemäßen Mittel und Verfahren werden im folgenden anhand einiger Beispiele näher erläutert.

#### Beispiel 1

Mit 4,5 g Vinylacetat, dem 0,01 g Polyäthylenoxid (Molmasse 3000), 0,15 g Triallylisocyanurat, 0,05 g Benzoylperoxid und 3 ml Magnetit Kolloid DHYS1 (Liquids Research, Wales) zugesetzt sind, wird in 50 ml Wasser, das 25 Gew.-% NaCl enthält, unter Stickstoff-Atmosphäre 12 h bei 60°C eine Suspensionspolymerisation durchgeführt. Es fallen magnetische, perlförmige Polymere mit einem Teilchendurchmesser von 4–8 µm und einem Magnetit-Gehalt von 32 Gew.-% an. Das Produkt wird nach entsprechendem Zentrifugationsschritt mehrfach mit Wasser gewaschen. Die anschließende 20stündige Hydrolyse zum Polyvinylalkohol erfolgt mittels 20%iger NaOH bei Raumtemperatur, der mehrere Waschschritte mit Wasser folgen. 0,1 g des anfallenden, getrockneten Produktes werden mit 2 ml 3 M NaOH und 1 ml Epichlorhydrin versetzt und 2 h bei 60°C aktiviert. Anschließend wird das Produkt abwechselnd mit Wasser und Aceton mehrfach gewaschen; dem folgt die Trocknung im Vakuum. Das Epoxidäquivalent beträgt 183 µMol/g Träger (ermittelt nach Sundberg und Porath, J. Chromatogr., 90, 89, 1974). 0,05 g des Epoxyträgers werden mit 0,5 ml 0,1 M Bicarbonat-Puffer, pH 9,8, in der 10 µg DNA (850 bp), die zuvor nach einem von Chu und Orgel, DNA, 4, 327, 1985, beschriebenen Verfahren am 5'-Ende amino-modifiziert wurde, für 24 h bei 35°C inkubiert. Die Probe wird anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen. Die Kopplungsausbeute beträgt 43% (photometrisch im Überstand gemessen). Um die gekoppelte DNA nach den bekannten Methoden (siehe "Advances in Biomagnetic Separation", Uhlen et al. Hrsg, Eaton Publishing Co., 1994) für die Genanalyse nutzen zu können, werden die Magnetpartikel in einem Magnetfeld (5 Spulenwindungen, Spulendurchmesser 5 cm, Spulenträger 12 cm) bei einer Frequenz von 500 kHz und einer Magnetfeldstärke von 11 kA/m für 2 Minuten induktiv aufgeheizt. Die hybridisierte, immobilisierte DNA wird hierdurch in die beiden Doppelstränge aufgetrennt, die durch Anlegen eines Neodym-Eisen-Bor-Handmagneten abgetrennt werden kann. Die weiteren Analysenschritte erfolgen entsprechend den bekannten Verfahren für die DNA- bzw. Genanalytik.

#### Beispiel 2

Eine Mischung bestehend aus 45 ml 2-Butanol und Toluol (55 : 45 Gew.-%), 9,6 ml unter Stickstoff destilliertem 2-Hydroxyäthyl-methacrylat, 0,95 g Polymethylmethacrylat (MW  $2.2 \times 10^5$ ), 4,2 ml mit Polyvinylpyrrolidon (MW 20,000) stabilisiertes Magnetit-Kolloid (hergestellt nach Tiefenauer et al., Bioconjugate Chem., 4, 347–352, 1993) und 0,18 g 2,2'-Azobis(isobutyronitril) wird über einen Zeitraum von 30 Minuten durch einen Stickstoffstrom entlüftet. Anschließend wird das Gemisch unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre für 4 Minuten mit Ultraschall behandelt (Bandelin Sonoplus Homogenisator GM 200, 200 W, 20 kHz). Danach erfolgt die Polymerisation unter Rühren (250 U/min) bei 70°C über einen Zeitraum von 7 Stunden. Das Polymerisat wird sodann vom Überstand magnetisch abgetrennt und mehrfach mit Toluol, Aceton und schließlich mit Wasser gewaschen. Es fallen Polymerperlen mit einer Korngröße von 3–5 µm an; der Magnetitanteil beträgt 36 Gew.-%. Eine 40 Gew.-%ige wässrige Suspension dieser Partikel wird in einem Magnetfeld gemäß Beispiel 1 in vier Minuten auf 65°C aufgeheizt.

0,2 g des über  $P_2O_5$  im Vakuum getrockneten Produktes werden mit je einem ml absolutem Dimethylformamid, in dem 0,6 mMol 4-Dimethylaminopyridin und 0,5 mMol 2-Fluor-1-methyl-pyridinium-toluol-4-sulfonat, gelöst sind, versetzt und 45 min bei Raumtemperatur aktiviert. Das Produkt wird mehrfach abwechselnd mit Dimethylformamid und Aceton gewaschen sowie zweimal mit 0,05 M Bicarbonat-Puffer, pH 9,2. 100 µg anti-Tumor Necrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) Antikörper, gelöst in einem ml des Waschpuffers, werden sodann durch Inkubation über einen Zeitraum von 24 h bei Raumtemperatur an den Träger gebunden. Kopplungsausbeute 64%. Zur Desaktivierung wird der Träger mehrfach mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,4, gewaschen und anschließend 12 h in 0,1 M Tris-HCl-Puffer/5% Glycerin, pH 7,5, inkubiert.

Der so gewonnene Träger wird zur Inaktivierung von TNF $\alpha$ , einem Pathogen, das ein starker Mediator für den septischen Schock ist, verwendet, indem der Träger mit Blut oder Serum in Kontakt gebracht wird und nach Bildung des TNF $\alpha$  durch einminütige Induktionsintervalle über einen Zeitraum von 10 min. induktiv aufgeheizt wird.

#### Beispiel 3

0,1 g induktiv aufheizbare Magnetpartikel, die gemäß Beispiel 2 hergestellt wurden, werden mit 0,1 g Bromcapronsäure, das in 2 ml 3 N NaOH gelöst ist, für 2 h bei 70% umgesetzt. Es folgt mehrfaches Waschen mit Wasser unter Zuhilfenahme eines jeweils magnetischen Abtrennschrittes. Der Träger wird sodann zweimal mit 0,005 M HCl gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,1 M Morpholino-äthansulfonsäure-Puffer (MES), pH 4,2, in dem 20 mg N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat gelöst sind, für 30 min. inkubiert. Nach der Aktivierung wird der Träger fünfmal mit Eiswasser gewaschen und sodann mit einem ml 0,05 M Bicarbonat-Puffer, pH 8,6, der 0,03 mg gelöstes Streptavidin enthält, über 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplungsausbeute 31% (ermittelt) nach Lowry et al, Biol. Chem., 193, 2654, 1951). Der so gewonnene Träger ist in der Lage, biotinylierte DNA-Einzel- oder Doppelstränge zu binden, die nach den bekannten Methoden in der Genanalytik zur Sequenzierung benutzt werden können.

#### Beispiel 4

2 ml einer 20 Gew.-%igen wässrigen Gelatinelösung werden mit 150 mg  $Ni_{0,24}Zn_{0,76}Fe_2O_4$  (Teilchengröße 30–80 nm, Tc = 75°C) versetzt und die Dispersion in 60 ml einer 5 Gew.-% enthaltenden Sorbitan-monooleat enthaltenden Toluol/Chloroform Mischung (40 : 60 Gew.-%) eingetragen. Nachdem durch Einleiten eines Argonstromes für 10 min. der Luftsauerstoff entfernt wurde, wird die Mischung unter Eiskühlung 2 min. gemäß Beispiel 2 mit Ultraschall behandelt und anschließend in einer 350 ml vorgekühlten Toluol/Chloroform/Sorbitan-monooleat Mischung entsprechend obiger Zusammensetzung unter Rühren (1000 U/min) eingetragen. Die Vernetzung der Gelatine-Ferrit-Tröpfchen geschieht durch anschließende Zugabe von 50 ml Glutaraldehyd-gesättigtem Toluol. Die Vernetzung wird unter Rühren bei 0°C über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt. Danach wird mehrfach mit Isopropanol, 50%iger wässriger Acetonlösung und schließlich dreimal mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5, gewaschen. Es werden Magnetpartikel mit einer Teilchengröße von 2–5 µm und einem Magnetkolloidanteil von 33 Gew.-% erhalten. Die gewonnenen Teilchen lassen sich in dem gemäß Beispiel 1 beschriebenen Magnetfeld innerhalb einer Minute

auf konstant 75°C aufheizen.

Die Aktivierung der Magnetpartikel mit 2 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8, der 12% Glutaraldehyd enthält, erfolgt für 4 h bei Raumtemperatur, der sich intensive Waschprozesse mit Wasser über einen Zeitraum von ca. einer Stunde anschließen.

An die Glutaraldehyd aktivierten Träger können nach den bekannten Verfahren spezifische, gegen Viren gerichtete Antikörper durch mehrstündige Inkubation in einem 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5–8,5, kovalent gebunden werden. Induktives Aufheizen der Magnetpartikel über einen Zeitraum von 10 min. bei 75°C führt zur Inaktivierung der Viren.

#### Beispiel 5

In eine gemäß Beispiel 4 hergestellte Gelatine-Suspension werden 140 mg eines Nickel-Zink-Ferrites mit der Zusammensetzung  $\text{Ni}_{0,73}\text{Zn}_{0,27}\text{Fe}_2\text{O}_4$  (Teilchengröße 40–70 nm,  $T_c = 95^\circ\text{C}$ ) eingetragen und anschließend mit Glutaraldehyd vernetzt. Die so erhaltenen Magnetpartikel lassen sich unter den in Beispiel 1 dargelegten magnetischen Wechselfeldbedingungen innerhalb einer Minute auf konstant 95°C aufheizen. 50 mg des so erhaltenen Trägers werden entsprechend obigem Beispiel mit 12%iger Glutaraldehyd-Lösung umgesetzt und anschließend mit Wasser gewaschen. An den aktivierten Träger werden durch zehnstündige Inkubation bei 30°C 5 µg am 5'-Ende amino-modifizierte DNA, die gemäß Beispiel 1 hergestellt wurde, gekoppelt. Die Ausbeute beträgt 46%.

Die immobilisierten DNA-Doppelstränge lassen sich durch dreiminütige Induktion bei 95°C gemäß Beispiel 1 in die Einzelstränge auftrennen, die sodann der herkömmlichen, weiteren Genanalyse zugänglich sind.

#### Beispiel 6

Ein von Pulfer und Gallo (In: "Scientific and Clinical Application of Magnetic Carriers", Häfeli et al. Hrsg., Plenum Press, New York, S. 445, 1997) beschriebenes Verfahren zur Herstellung von magnetischen Trägern wird in modifizierter Weise wie folgt benutzt: 4 ml einer 25 Gew.-%igen wässrigen Dextranlösung (mittlere Molmasse 40.000) wird mit 1,2 ml 10 M NaOH versetzt und 3 ml einer wässrigen MnZnFerrit-Emulsion (BASF, Teilchengröße ca. 12 nm) zugesetzt. Die Mischung wird für 2 min. gemäß Beispiel 2 unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt. Die Mischung wird sodann mittels einer Spritze in 80 ml herkömmlichem Baumwollsaatöl, das 0,3 g Polyoxyäthylen-Sorbitan-Monooleat enthält, eingespritzt und nochmals für 3 min. bei 0°C ultrabeschallt. Unter Rühren (2000 U/min) werden 200 ml Äther, in dem 4 g Bromcyan gelöst sind, zugegeben. Nach 15 min. werden die Magnetpartikel kurz abzentrifugiert und mehrfach mit Äther und Äthanol abwechselnd gewaschen. Die gewonnenen Partikel weisen eine Größe von 2–5 µm und einen Magnetanteil von 26 Gew.-% auf. Durch Anlegen des magnetischen Wechselfeldes gemäß Beispiel 1 können die Magnetpartikel innerhalb von 2 min. auf Temperaturen >100°C aufgeheizt werden.

0,1 g der erhaltenen Dextranpartikel werden anschließend mit 2 ml 0,2 M Bicarbonat-Puffer, pH 11,3, in dem 10% Bromcyan gelöst sind, für 15 min. aktiviert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser und dem Aktivierungs-Puffer wird der Träger für 10 h in 2 ml 0,2 M Bicarbonat-Puffer, pH 9,0, der 20 Gew.-% Aminocaprinsäure enthält, bei 4°C inkubiert. Der mehrfach mit Wasser gewaschene, carboxylierte Träger wird zweimal in 0,005 M HCl inkubiert, einmal mit Wasser nachgewaschen und sodann mit 2 ml 20 mg

N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimidmethyl-p-toluolsulfonat enthaltendem 0,1 M ES Puffer, pH 4,2, für 30 min. bei Raumtemperatur aktiviert. Es wird fünfmal mit Eiswasser gewaschen, gefolgt von einer 24stündigen Inkubation eines 2 ml 10 µg Streptavidin enthaltenden 0,05 M Phosphat-Puffers, pH 8,5. Die Kopplungsausbeute beträgt 67%.

Der so gewonnene Träger bindet biotinylierte DNA-Fragmente, die mit Hilfe eines 1 M NaCl enthaltenden 0,1 M Glycin-NaOH-Puffers, pH 9,0 in Verbindung mit mehrmaligem, kurzem induktivem Aufheizens (<1 min.) weitgehend quantitativ eluiert werden können.

#### Beispiel 7

0,05 g nach Beispiel 6 hergestellter Dextran-Träger werden mit Bromcyan und N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat gemäß obiger Darstellungsweise aktiviert und mit 1 ml 0,05 M Phosphat-Puffer, pH 8,5, in dem 10 µg eines gegen das Bakterium *Mycobacterium Tuberculosis* gerichteten Antikörpers gelöst sind, 30 h bei 4°C inkubiert. Die beschichteten Träger sind in der Lage, Tuberkulose Bakterien zu binden, die anschließend durch eine dreiminütige Induktion gemäß Beispiel 1 inaktiviert werden.

#### Beispiel 8

20 ml einer 2%igen wässrigen Na-Alginatlösung (MW 70.000), die 0,1%ige Polyvinylalkohol (MW 22.000) enthält, werden mit 150 mg Magnetit (Teilchengröße 8–15 nm), das nach der Vorschrift von Kang et al. (Chem. Mater., 8, 2209, 1996) hergestellt wurden, versetzt und 3 min. unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt. Nach einem zweiminütigen Intervall unter ständiger Kühlung werden 50 µg Insulin (MW 5777, 25 E/mg) zu der Suspension gegeben, die sodann nochmal für zwei min. unter Kühlung beschallt wird. Die Mischung wird sodann in 220 ml Siliconöl (Viskosität<sub>20°C</sub>: 100 mPa · s), in dem 10 Vol.-% Polyäthylenpolypropylen-Blockcopolymeres (Pluronic® 6200) gelöst sind, unter kurzem Rühren eingetragen und danach dreimal für je eine Minute mit jeweils einer Minute Intervall unter ständigem Kühlen beschallt. Die Mischung wird danach intensiv gerührt (3000 U/min). Nach 10 Sekunden werden 40 ml einer 0,2 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zugetropft und die Suspension nach erfolgter Zugabe der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung für eine Minute weitergerührt. Der Polymerträger wird sodann durch kurzes Abzentrifugieren von der Dispergierlösung abgetrennt. Dem folgt mehrmaliges Waschen mit einer 10%igen NaCl-Lösung und einer Phosphat-gepufferten Salzlösung, pH 7,2. Es werden 4–12 µm große Magnetpartikel erhalten, die eine Insulin-Einkapselungsausbeute von >60% aufweisen. Eine 50 Gew.-%ige wässrige Suspension der Teilchen läßt sich innerhalb von 10 min. in dem in Beispiel 1 beschriebenen Hochfrequenzfeld auf Temperaturen von >50°C aufheizen.

Die Magnetpartikel können als Medikamentendepot verwendet werden, wobei sich durch das induktive Aufheizen die Insulinabgabe in Abhängigkeit von der Temperatur und Heizdauer um den Faktor 1,5–2 beschleunigen läßt.

#### Beispiel 9

10 ml einer 10%igen Stärkelösung werden bei 90°C mit 350 mg Polyvinylpyrrolidon (MW 15 000) stabilisiertem  $\text{MnCr}_2\text{O}_4$  (Teilchengröße 30–85 nm,  $T_c = 77^\circ\text{C}$ ) versetzt und 3 min. mit Ultraschall gemäß Beispiel 2 behandelt. Die Mischung wird sodann in 100 ml auf 80°C vorgeheiztes

Pflanzenöl, das 4 ml eines Polyäthylenpolypropylen-Blockcopolymeren (Pluronic® 6100) enthält, eingerührt (2000 U/min). Nach 2 min. wird die Mischung mit Hilfe eines Eisbades unter Rühren abgekühlt. Es fallen feste 1–4 µm große Partikel mit einem Magnetanteil von 31% an, die durch abwechselndes Suspendieren in Eiswasser und 50% wäßriger Acetonlösung mehrfach gewaschen werden. Das im Vakuum getrocknete Produkt wird anschließend mit 3 ml Epichlorhydrin und 5 ml 4 M NaOH für 2 h bei 55°C vernetzt. Dem schließt sich intensives, abwechselndes Waschen mit Wasser und wäßriger Acetonlösung an. Um restliche Oxirangruppen zu entfernen, erfolgt eine 24stündige Inkubation des Trägers in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,5. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser und 0,1 M Bicarbonat-Puffer, pH 11,3, werden 100 mg der zuvor im Vakuum getrockneten Magnetpartikel durch eine 15minütige Umsetzung mit 30 mg Bromcyan in 2 ml 0,1 M Bicarbonat-Puffer, pH 11,3, bei Raumtemperatur aktiviert. Nach mehrmaligem Waschen mit dem Aktivierungspuffer und Wasser wird durch zwölfstündige Inkubation von 1,5 ml 20 µg anti-CEA-Antikörper (Carcinoembryonales Antigen) enthaltendem 0,1 M Bicarbonat-Puffer, pH 8,5, bei 4°C ein Träger gewonnen, der in der Lage ist, CEA tragende Tumorzellen spezifisch zu binden. Durch vierminütiges induktives Aufheizen gemäß Beispiel 1 lassen sich die Tumorzellen gänzlich inaktiviert.

#### Patentansprüche

1. Magnetpartikel bestehend aus einem induktiv aufheizbaren magnetischen Kern und einer polymeren Matrix, in die der magnetische Kern vollständig eingekapselt ist und an die Liganden chemisch gekoppelt sind.
2. Magnetpartikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der magnetische Kern aus induktiv aufheizbaren nanopartikulären oder mikropartikulären magnetischen Teilchen besteht, die einen Gewichtsanteil von mindestens 20% an dem Magnetpartikel ausmachen.
3. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der magnetische Kern aus ferromagnetischen, ferrimagnetischen oder superparamagnetischen Kolloiden oder Suspensionen besteht.
4. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der induktiv aufheizbare Kern aus Doppelmetall-oxid/hydroxiden oder Magnetit besteht.
5. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der induktiv aufheizbare Kern ein Ferrit mit einer Curie-Temperatur von 40–250°C ist, das die allgemeine Formel  $Me_{1-x}Zn_xFe_2O_4$  aufweist, worin Me Eisen, Kobalt oder Nickel sein kann.
6. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die polymere Matrix aus Polysacchariden oder Polysaccharid-Abkömmlingen, Algin-säuren, Alginsäureestern, Hyaluronsäure, Hyaluronsäureestern, Zellulose, Stärke, Agarose, Dextran, Dextrin besteht.
7. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die polymere Matrix aus natürlichen Proteinen, abgewandelten Proteinen oder Polyaminosäuren besteht.
8. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die polymere Matrix aus einem synthetischen Hydroxyl-, Aldehyd-, Amino- oder Carboxylgruppen tragenden Polymeren oder Copolymeren besteht.
9. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 8, dadurch

gekennzeichnet, daß an die polymere Matrix Antikörper, Oligosaccharide, Blutgruppenantigene, Oligonukleotide, Polynukleotide, Enzyme, Avidin, Streptavidin, Biotin, Zellrezeptoren, Antikörper gegen Zellrezeptoren, Zelloberflächenmarker, Lektine oder Glykoproteine chemisch gebunden sind.

10. Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß an die polymere Matrix Polymerasen gebunden sind.

11. Verfahren zur Herstellung induktiv aufheizbarer Magnetpartikel gemäß Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß nanopartikuläre oder mikropartikuläre Magnetteilchen in eine polymere Matrix mittels Emulsionspolymerisation, Suspensionspolymerisation, Präzipitationsmethode ("Solvent Evaporation Technik") oder Suspensions-Vernetzung eingekapselt werden und an deren Oberfläche mit Bioliganden koppelnde, reaktive Gruppen erzeugt werden.

12. Verwendung induktiv aufheizbarer Magnetpartikel nach einem oder mehreren Ansprüchen 1 bis 10 zur Analyse von Nukleotidsequenzen.

13. Verwendung induktiv aufheizbarer Magnetpartikel nach einem oder mehreren Ansprüchen 1 bis 10 zur Abtrennung und Inaktivierung von Zellen, Viren, Bakterien oder Pilzen aus Blut, Plasma, Serum oder Blutkonserven.

14. Verwendung induktiv aufheizbarer Magnetpartikel nach einem oder mehreren Ansprüchen 1 bis 10 als Medikamentendepot in der medizinischen Therapie.